

Overzichtsartikel

De rol van ABC-transporters in fysiologie en pathofysiologie, en hun betrokkenheid bij de resistentie voor chemotherapie

P.L.M. de GROUW¹ en R.A.P. RAYMAKERS²

ABC-genen vertegenwoordigen een grote familie van transmembraaneiwitten, welke tot expressie komen in alle levende cellen, waar ze essentieel zijn voor energie-afhankelijk transport. Mutaties aan deze genen veroorzaken of dragen bij aan diverse genetische aandoeningen, waaronder bijvoorbeeld taaislijmziekte. ABC-transporters zijn daarnaast uitvoerig bestudeerd vanwege hun rol bij de ontwikkeling van resistentie tegen chemotherapie. Verhoogde expressie leidt tot verhoogde cellulaire efflux voor het toegepaste geneesmiddel, maar ook vele andere niet verwante middelen, multidrugresistentie genaamd.

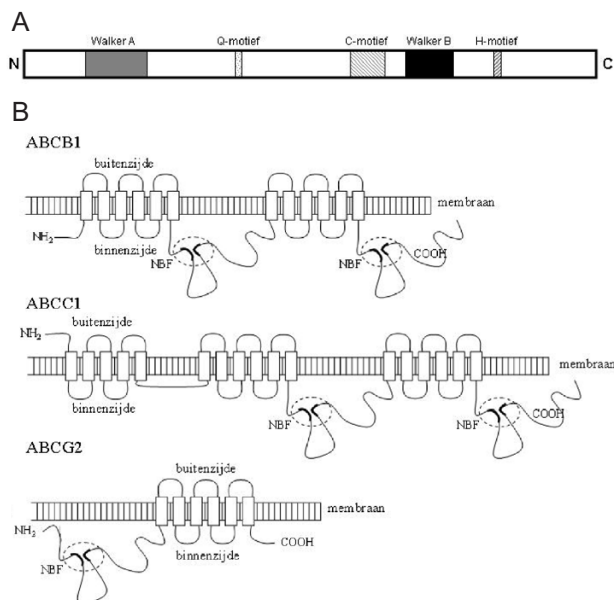
De resultaten van klinische studies met specifieke transporterremmers, om intracellulaire accumulatie van chemotherapie te verhogen, vallen tegen door een grote redundantie in ABC-transporters met name op leukemische stamcellen. Vele ABC-transporters komen tot expressie op normale hemopoëtische stamcellen, grotendeels overeenkomend met leukemische stamcellen. Daarnaast blijkt de expressie van diverse transporters opgereguleerd te worden na blootstelling aan chemotherapie. Deze resultaten vormen een mogelijke basis voor het verbeteren van antileukemie behandeling.

Trefwoorden: ABC-transporters; drugresistentie; hemopoëtische stamcellen; acute myeloïde leukemie

De humane ATP-bindingcassette(ABC)transporter-superfamilie

De ATP-bindingcassette(ABC)superfamilie bevat genen die coderen voor membraaneiwitten die betrokken zijn bij energie-afhankelijk transport, via ATP, over membranen (cel of organel, zoals mitochondrieën) van een groot aantal substraten, zoals aminozuren, ionen, suikers, vetten en geneesmiddelen (1, 2). De ABC-genen vertegenwoordigen de grootste familie van

transmembraaneiwitten. Met behulp van kloneringen en in-vitro-experimenten is veel duidelijk geworden over de structuur van ABC-transporters. Deze eiwitten worden geïdentificeerd als ABC-transporter gebaseerd op de sequentie en organisatie van het ATP-bindende domein, ook wel de 'nucleotide binding folds' (NBF) genaamd. De NBF's bevatten karakteristieke motieven welke terug te vinden zijn in alle ABC-transporters, namelijk Walker-A- en Walker-B-motieven, welke van elkaar gescheiden worden door ~90-120 aminozuren. ABC-genen bevatten daarnaast het C-motief, ook wel ABC-domein genoemd, dat zich 'upstream' van de Walker-B-locatie bevindt (figuur 1A). Hiermee onderscheiden genen van de ABC-superfamilie zich van andere ATP-bindende eiwitten (3). In de NBF's bevinden zich ook het Q-motief, dat het transmembraan-



Figuur 1. Schematische weergave van de structuur van de 'nucleotide-binding fold' en de transporters ABCB1, ABCC1 en ABCG2. (A) De 'nucleotide-binding fold' (NBF) is opgebouwd uit een Walker-A-, Q-motief, C-motief, Walker-B- en H-motief. (B) ABCB1 en ABCC1 zijn 'full transporters'; ABCB1 bestaat uit twee identieke delen met beide 6 transmembraandomeinen en een intracellulair gebied met de bindingsplaats voor nucleotiden (NBF). ABCC1 heeft een extra N-terminaal domein met 5 transmembraandomeinen. ABCG2 is een 'half transporter', bestaande uit een NBF-domein met 6 transmembraandomeinen.

Laboratorium Algemene Klinische Chemie, Academisch Medisch Centrum, Amsterdam¹ en Afdeling Hematologie, Universitair Medisch Centrum Utrecht, Utrecht²

Correspondentie: dr. P.L.M. de Grouw, Academisch Medisch Centrum, Laboratorium Algemene Klinische Chemie, Meibergdreef 9, 1105 AZ Amsterdam
Email: p.l.degrouw@amc.uva.nl

domein verbindt met het C-motief, en het H-motief, dat belangrijk is voor de interactie van het ABC-domein met ATP. Het functionele eiwit bestaat uit twee NBF's en twee transmembraan(TM)domeinen (figuur 1B). Daarnaast zijn er ook 'half transporters' die functioneel actief zijn met 1 NBF- en 1 transmembraandomein. Het transmembraandomein bevat 6-11 transmembraandelen welke de specificiteit voor een substraat bepalen (4). De NBF's zijn gelokaliseerd in het cytoplasma en verzorgen de energie, die nodig is voor het transport van een substraat over het membraan. ABC-transporters functioneren meestal unidirectioneel. ABC-transporters zijn aanwezig in alle levende cellen, en zijn essentieel voor veel energie-afhankelijke transportprocessen in de cel en de celorganellen. Mutaties in deze genen veroorzaken, of dragen bij aan, diverse genetische aandoeningen, zie tabel 1.

De genen voor ABC-transporters zijn wijd verspreid in het genoom, en tonen een hoge overeenkomst in aminozuursequentie tussen eukaryoten. Tot op heden zijn er 49 humane ABC-transporters beschreven. Op basis van fylogenetische analyse kan de ABC-superfamilie worden onderverdeeld in zeven subfamilies (A t/m G).

ABCA-subfamilie

De ABCA-subfamilie bestaat uit 12 transporters die kunnen worden verdeeld in twee subgroepen. De eerste subgroep bevat 7 genen, welke gelokaliseerd zijn over 6 verschillende chromosomen (ABCA1-4, ABCA7, ABCA12 en ABCA13). Drie van de 12 ABCA-transporters (ABCA1, ABCA3 en ABCA4) zijn functioneel gekarakteriseerd en betrokken bij lipidentransport. Daarnaast zijn deze drie ABCA-transporters geassocieerd met verschillende deficiënties (tabel 1). De tweede groep van 5 ABCA-genen (ABCA5, ABCA6, ABCA8-ABCA10) is gelegen in een cluster op chromosoom 17q24. Er bestaat een hoge homogeniteit tussen deze 5 verschillende transporters; ze worden de ABCA6-like transporters genoemd. De substraten en functies van deze groep van ABCA-transporters zijn nog slechts ten dele bekend. Recente studies suggereren echter een betrokkenheid bij het transmembraantransport van endogene lipidsubstraten, zoals fosfolipiden en essentiële vetzuren (5-7).

ABCB-subfamilie

De ABCB-subfamilie is exclusief aanwezig in zoogdieren, en omvat zowel complete als halve transporters. Momenteel zijn er vier complete en zeven halve transporters beschreven in de ABCB-subfamilie. ABCB1 is de eerste humaan gekloneerde ABC-transporter die in staat is het multidrugresistente (MDR) fenotype te veroorzaken in tumorcellen in vitro. ABCB1 komt primair tot expressie in de lever en de bloed-hersen-barrière, en is waarschijnlijk betrokken bij het beschermen van het lichaam alsmede de hersenen tegen toxische middelen. ABCB4 en ABCB11, beide gelokaliseerd in de lever, zijn betrokken bij de secretie van galzuren (8). Daarnaast is van deze transporters ook bekend dat ze in staat zijn tot het transporteren van chemotherapeutische substraten (9, 10).

ABCC-subfamilie

De ABCC-subfamilie bestaat uit 13 complete transporters met een grote diversiteit in functie, waaronder iontransport, secretie van toxines en signaaltransductie. Mutaties in ABCC7 met daardoor verlies van functie van de transporter leidt tot taaislijmziekte of mucoviscidose (cystic fibrose, CF) (4, 11). ABCC8- en ABCC9-eiwitten binden sulfonylureum en reguleren de kaliumkanalen betrokken bij insulinesecretie. Mutaties in bovenstaande ABCC-genen leiden tot verschillende ziektebeelden (zie tabel 1). De overige ABCC-transporters zijn 'multidrug resistance protein' (MRP) gerelateerde genen. ABCC1 (MRP1, 'multidrug resistance protein 1') is ontdekt als een klassiek MDR-gen, welk een breed scala aan chemisch onverwante geneesmiddelen kan transporteren vanuit verschillende cellen in het lichaam. Het komt voornamelijk tot expressie in lever en nier (organische anionen, medicijnen geconjugeerd aan glutathion, glucuronaat of sulfaat, en antracyclines). ABCC2 en ABCC3 zijn, net als ABCC1, betrokken bij het in-vivotransport van organische anionen (12).

ABCD-subfamilie

De ABCD-subfamilie bestaat in het humane genoom uit 4 genen. Al deze transporters zijn zogenaamde half-transporters en zijn gelokaliseerd in het peroxisoom. Peroxisomale ABC-transporters zijn half-transporters

Tabel 1. Ziektebeelden geassocieerd met mutaties in ABC-transporters (85)

ABC-transporters	Geassocieerde ziekte
ABCA1	Ziekte van Tanger, familiere hypo-alfa-lipoproteïnemie, premature atherosclerose
ABCA3	Neonatale pulmonaire oppervlaktedeficiëntie
ABCA4	Stargardt-ziekte, andere oogafwijkingen
ABCA12	Gelammelleerde ichthyosis, harlekijnichtyose
ABCB2	Immuundeficiëntie
ABCB3	Immuundeficiëntie
ABCB4/11	Progressieve familiere intrahepatische cholestase
ABCC2	Dubin-Johnson-syndroom (hyperbilirubinemie)
ABCC6	Pseudoxanthoma elasticum (PXE)
ABCC7	Cystic fibrose (CF)
ABCC8	Familiere persistente hyperinsulinemische hypoglykemie, autosomaal dominante diabetes type 2
ABCC9	Gedilateerde cardiomyopathie met ventriculaire tachycardie
ABCD1	X-gebonden adrenoleukodystrofie
ACG5/8	Sitosterolemie

en alleen functioneel na dimerisatie met andere half-transporters, waarbij er sprake kan zijn van homo- of heterodimeren (13). Mutaties in ABCD1 veroorzaken X-gelinkte adrenoleukodystrofie, afbraak van de witte stof in de hersenen en bijnierfunctiestoornissen (14). De functie van de andere ABCD-transporters is nog onbekend, maar de grote homogeniteit met ABCD1 suggereert dat ze mogelijk zijn betrokken bij het vetzuurmetabolisme.

ABCE- en ABCF-subfamilie

In tegenstelling tot alle andere ABC-transporters bevatten de transporters van de ABCE- en ABCF-families geen transmembraandomein. De functie van de ABCE-transporter en de drie ABCF-transporters zal daardoor niet transportgerelateerd zijn (15, 16).

ABCG-subfamilie

De humane ABCG-subfamilie bestaat uit 5 leden (ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5 en ABCG8). In knaagdieren is er nog een ABCG-transporter beschreven, *abcg3*. Dit gen is sterk gerelateerd aan het knaagdier *abcg2*-eiwit en het humane ABCG2. Er wordt gesuggereerd dat er ook een humaan *abcg3* bestaat (17). De meeste humane ABCG-genen lijken betrokken te zijn bij het lipiden- en sterolmetabolisme. ABCG2 is een drugtransporter en voor het eerst beschreven in cellijnen die geen ABCB1 of ABCC1 tot overexpressie brengen (4). ABCG2 wordt verantwoordelijk gehouden voor het ontstaan van de zogenaamde 'side populatie' (SP). Dit is een groep cellen die de kleurstof Hoechst 33342 de cel uitpompen, waardoor er een 'Hoechst-zwakke' populatie ontstaat. De export van de kleurstof wordt gecorreleerd aan een hoge expressie van de ABCG2-transporter in cellijnen die zijn geselecteerd op basis van drugresistentie. Door de hoge expressie van ABCG2 op stamcellen is hiermee een methode gecreëerd om stamcellen te verrijken (18).

Rol van ABCB1, ABCC1 en ABCG2 in multidrug-resistentie

Van alle ABC-transporters zijn ABCB1, ABCC1 en ABCG2 het meest bestudeerd. Deze 3 transporters hebben de mogelijkheid om een palet aan chemotherapeutica uit de cel te pompen, daardoor een relatieve resistentie veroorzakend (MDR).

ABCB1

De meest bestudeerde ABC-transporter is 'p-glycoprotein', het product van het ABCB1(MDR1)-gen. ABCB1 was de eerste humane ABC-transporter die gekloneerd en gekarakteriseerd is met de eigenschap kankercellen multidrugresistent te maken voor chemotherapie (19). ABCB1 is betrokken bij het transport van een groot spectrum van moleculen (xenobiotica), waaronder verschillende antitumormiddelen zoals antracyclines (daunorubicine, doxorubicine), vinca-alkaloïde (vinblastine, vincristine), etoposide, mitoxantrone en topotecan (20, 21). Verschillende remmers voor ABCB1 zijn beschreven, waaronder calciumkanaalremmers (verapamil), anti-aritmica (quinidine), hydrofobe peptides (cyclosporine A, PSC833) en andere geneesmiddelen (Fucidin, GF120918) (21).

ABCB1 is gelokaliseerd op chromosoom 7q21, bevat 28 exonen en het cDNA omvat 4,5 kb (22). ABCB1 is een klassieke ABC-transporter, bestaande uit twee homologe delen, welke opgebouwd zijn uit 6 transmembraan(TM)domeinen en een ATP-bindend domein (NBD) (figuur 1). Alleen het TM-domein is voldoende voor transport van geneesmiddelen, aangezien een deletiemutant die het NBD mist ook in staat is om substraten te binden (23). Van verschillende mutaties is gerapporteerd dat ze de affiniteit en/of het transport van medicatie door ABCB1 beïnvloeden (20). Verscheidende van de mutaties zijn gelokaliseerd in een van de twee TM-domeinen, voornamelijk 5, 6 en 11, 12, maar ze zijn ook gevonden in de rest van het molecuul (21). ABCB1 komt hoog tot expressie in gepolariseerde epitheelcellen, voornamelijk in het apicale membraan, zoals bijnier, lever, darm en nieren en in tumoren ontstaan vanuit deze organen (24). ABCB1-knock-outmuizen, welke beide ABCB1-genen missen, zijn levensvatbaar, gezond en hebben een normale fertiliteit. Echter, deze muizen zijn extreem gevoelig voor xenobiotica, wat de rol van ABCB1 in de opname, eliminatie en detoxificatie van geneesmiddelen bevestigt (25, 26).

ABCC1

Het ABCC1/MRP1-gen is voor het eerst geïdentificeerd in een drugresistente humane longkankercellijn (H69AR). In deze H96AR-cellijn was er resistentie zonder overexpressie van ABCB1 (28). Het ABCC1-gen is gelokaliseerd op chromosoom 16p13.1, codeert voor een 190 kDa-membraaneiwit en komt slechts voor 19% overeen met ABCB1. Vergeleken met ABCB1, wordt ABCC1 gekarakteriseerd door de aanwezigheid van een extra N-terminale verlenging bestaande uit 5 transmembraandomeinen (figuur 1). De substraatspecificiteit voor ABCB1 en ABCC1 is deels vergelijkbaar, maar waar ABCB1 de grootste affiniteit heeft voor grote hydrofobe kationen, is ABCC1 het meest effectief in het transporteren van organische anionen. ABCC1 is in staat tot het uit de cel verwijderen van geneesmiddelen geconjugeerd aan glutathion, anthracycline, vinca-alkaloïden en leukotrienen (LTC4) (12, 29, 30). Voor ABCC1 zijn in vitro verschillende remmers beschreven zoals probenecide, MK571 en indometacine (31-33).

ABCC1 komt zeer breed tot expressie, met hoge expressieniveaus in de longen, testis, nieren, skelet- en hartspieren en de placenta (28, 34). Daarnaast komt ABCC1 tot expressie in verscheidene solide tumoren, waaronder long-, borst- en prostaat-kankerweefsel. De typerende lokalisatie voor ABCC1 is in het plasmamembraan, aan de basolaterale kant van de gepolariseerde cellen, in tegenstelling tot de apicale lokalisatie van ABCB1.

ABCC1-knock-outmuizen zijn levensvatbaar en vruchtbaar, echter blootstelling aan geneesmiddelen of ontstekingsstimuli leidt tot een verminderde excretie van onder andere LTC4. Het ontbreken van ABCC1 leidt tot verhoogde gevoeligheid voor etoposide na intraveneuze toediening en omgekeerd beschermt ABCC1-muizen tegen weefselschade veroorzaakt door etoposide. ABCC1 lijkt dus te beschermen tegen blootstel-

ling aan xenobiotica (inclusief chemotherapeutica) (35, 36). Zeer recent werd de rol van ABCB1 in de cellulaire export van cobalamine (vitamine B12) vanuit de darmcel naar het plasma beschreven. Knock-outmuizen vertoonden een verlaagde plasmacobalamineconcentratie (37).

ABCG2

MCF-7/AdrVp is een multidrugresistente humane borstkankercellijn die ATP-afhankelijke verminderde intracellulaire accumulatie van antracyclines laat zien in de afwezigheid van ABCB1 en ABCC1. In 1998 is de ABC-transporter betrokken bij MDR in deze cellijn gekloneerd en 'breast cancer resistant protein' (BCRP, ABCG2) genoemd. De expressie van ABCG2 op zowel eiwit als mRNA is ook aangetoond in verschillende humane tumoren, waaronder hematologische maligni-

teiten en solide tumoren. ABCG2 veroorzaakt resistentie tegen mitoxantrone, doxorubicine en daunorubicine en is betrokken bij een ATP-afhankelijk transport van rhodamine 123 (38). Uit in-vitro- en muisexperimenten is gebleken dat fumitremorgine C (FTC) een specifieke remmer voor ABCG2 is (39, 40).

Het ABCG2-gen is gelokaliseerd op chromosoom 4q22 en verschilt van ABCB1 en ABCC1 aangezien het functioneert als een homodimeer, dat bestaat uit twee identieke delen. Het wordt daarom ook een 'half-transporter' genoemd (figuur 1). ABCG2 komt vooral tot expressie op celpopulaties met een primitief fenotype, waaronder embryonale en hemopoëtische stamcellen, placenta, pancreas, galgangkanaaltjes, colon, dunne darm en spieren (41). Overexpressie van ABCG2 wordt vaak gevonden in MDR-cellijnen welke geselecteerd zijn na blootstelling aan mitoxantrone,

Tabel 2. ABC-transporters welke bekend zijn met drugtransport en drugresistentie

Transporter	Gebruikelijke naam	Weefsellocalisatie	Niet-chemotherapeutische substraten	Chemotherapeutische substraten (bekend en verwacht)
ABCA2	ABCA2	Hersenen, monocyt	Steroïde derivaten, lipiden	Estramustine
ABCB1	P-gp, MDR1	Darmkanaal, lever, nieren, placenta, bloed-hersenbarrière	Medicatie, neutrale en kationische bestanddelen	Doxorubicine, daunorubicine, vincristine, vinblastine, actinomycin-D, paclitaxel, docetaxel, etoposide, tenoposide, bisantrene, STI-571
ABCB4	MDR2	Lever	Fosfatidylcholine, sommige hydrofobe medicatie	Paclitaxel, vinblastine
ABCB11	BSEP, SPGP	Lever	Galzouten	Paclitaxel
ABCC1	MRP1	Alle weefsels	Glutathion en andere conjugaten, organische anionen, LTC4	Doxorubicine, epirubicine, etoposide, vincristine, methotrexaat
ABCC2	MRP2, cMOAT	Lever, nieren, darmkanaal	Glutathion en andere conjugaten, organische anionen, LTC4	Methotrexaat, etoposide, doxorubicine, cisplatin, vincristine, mitoxantrone
ABCC3	MRP3	Pancreas, nieren, darmkanaal, lever, bijnieren	Glucuronaat en glutathion conjugaten, galzuren	Etoposide, tenoposide, methotrexaat, cisplatin, vincristine, doxorubicine
ABCC4	MRP4	Prostaat, testis, ovarium, darmkanaal, pancreas, longen	Nucleotideanalogen, organische anionen	Methotrexaat, thiopurines
ABCC5	MRP5	Meeste weefsels	Nucleotideanalogen, cyclische nucleotiden, organische anionen	6-mercaptopurine, 6-thioguanine
ABCC6	MRP6	Lever, nieren	Anionische cyclische pentapeptiden, glutathion conjugaten, LTC4	Etoposide, tenoposide, doxorubicine, daunorubicine
ABCC10	MRP7	Veel weefsels, lage expressie	Amfipatische anionen	Docetaxel, paclitaxel, vincristine, vinblastine
ABCC11	MRP8	Meeste weefsels, behalve nieren, milt en colon	Steroïde sulfaten, nucleotideanalogen	Purine- en pyrimidinenucleotide-analogen
ABCG2	MXR, BCRP	Placenta, darmkanaal, hart, lever	Prazosin	Doxorubicine, daunorubicine, mitoxantrone, topotecan, SN-38

P-gp: 'p-glycoprotein', MDR: 'multidrug resistance', BSEP: 'bile salt export pump', SPGP: 'sister of p-glycoprotein', MRP: 'multidrug resistance-associated protein', cMOAT: 'canalicular multispecific organic anion transporter', MXR: 'mitoxantrone resistant protein', BCRP: 'breast cancer resistant protein', LTC4: leucotriene C4, STI-571: een tyrosinekinaseremmer.

waaronder cellijnen van humane borstkankertumoren-, maagtumoren-, fibrosarcomen- en myelomenoorsprong (42). ABCG2-knock-outmuizen laten geen karakteristiek fenotype zien, maar hebben wel een verhoogde intracellulaire accumulatie van toxische substanties. De farmacokinetiek is hierbij van groot belang, waarbij voornamelijk de eliminatieroute van invloed kan zijn op toxiciteit (43, 44).

Andere transporters betrokken bij multidrug-resistentie

Op basis van de overeenkomsten in sequentie zijn er in het humane genoom 49 ABC-transporters beschreven. De functies van deze transporters zijn erg divers, ze omvatten: opname in de cel (van verschillende organen), verdeling en uitscheiding uit de cel van farmacologische substraten en endogene bestanddelen. Ondanks deze veralgemenisering is er van een groot aantal ABC-transporters weinig bekend over specifieke functies. Gezien de grote overeenkomst tussen de verschillende ABC-transporters zou men verwachten dat, naast ABCB1, ABCC1 en ABCG2, er andere ABC-transporters geassocieerd zijn met verminderde gevoeligheid voor chemotherapie.

Momenteel is er voor 13 ABC-transporters betrokkenheid beschreven bij het ontwikkelen van resistentie tegen chemotherapeutica (tabel 2) (9, 10). Recente studies, waarin verschillende MDR-cellijnen gescreend zijn op de expressie van ABC-transporters, hebben laten zien dat niet alleen bekende MDR-genen tot overexpressie komen maar ook andere ABC-genen die mogelijk een rol zouden kunnen hebben in MDR (ABCA4, ABCA7, ABCB2, ABCB3, ABCB6, ABCB8, ABCB9, ABCF2, ABCF3 en ABCG1) (45). De viabiliteit van de cellijn, zoals aantal doorlopen passages is hierbij wel van belang, daarom wordt een cellijn voor resistentie-inductie onder lage dosis chemotherapie gekweekt. De vele transporters betrokken bij MDR suggereren een grote mate van redundantie, reden waarom knock-outmodellen van één transporter veelal niet tot een overtuigend fenotype leiden en de effecten van specifieke remmers in klinische studies tegenvallen.

ABC-transporters en stamcellen

Hemopoëtische stamcellen kunnen van (volledig) gedifferentieerde cellen worden onderscheiden op basis van vele eigenschappen. Samenhangend met de mogelijkheid tot zelfvernieuwing, de proliferatiepotentie en de eigenschap tot differentiëren in verschillende richtingen, verschillen stamcellen qua functionaliteit en brengen ze andere celoppervlakmarkers tot expressie. Een intrigerende eigenschap van hemopoëtische stamcellen is de hoge expressie van veel ABC-transporters. Gebruik makend van specifieke substraten van ABC-transporters, zoals de fluorescerende stof rhodamine 123 (Rho123), kunnen stamcellen worden verrijkt ten opzichte van de meer uitgerijpte hemopoëtische cellen. Na flowcytometrisch sorteren van muizenbeenmergcellen op basis van Rho123-expressie bleek een celpopulatie met Rho^{low}-cellen in staat tot herstel van beenmerg op lange termijn na injectie bij bestraalde muizen. Dit in tegenstelling tot de Rho^{high}-cellen welke alleen in staat zijn tot kortetermijnrepopulatie.

Het mechanisme achter dit fenotype zoals beschreven is: het actief verwijderen van de fluorescente kleurstof Rho-123 specifiek voor ABC-transporters, door ABCB1 (46-48). Een andere fluorescente stof die voor het verrijken van de stamcel fractie wordt gebruikt is Hoechst 33342. Hoechst-zwakke cellen kunnen uit het beenmerg worden geïsoleerd als een zogenoemde 'side-population' (SP), die ontstaat door het meten van Hoechst op twee golflengtes. Deze populatie is verrijkt voor onrijpe stamcellen met de capaciteit voor hemopoëtische repopulatie. Hoechst is beschreven als substraat voor ABCB1, ABCC1 en ABCG2. Vergelijking van mRNA-expressieniveaus heeft laten zien dat ABCG2 overwegend tot expressie komt op beenmerg-SP-cellen. Bovendien geeft versterkte expressie van ABCG2 in beenmergcellen een significante toename van het SP-fenotype. Deze bevindingen laten zien dat ABCG2 een marker is voor stamcellen (18, 41, 49, 50). Het combineren van de humane stamcelmarker CD34 met Hoechst- en Rho123-kleuring maakt het mogelijk een subpopulatie te sorteren van humane primitieve voorlopercellen, die specifieke stamcelkarakteristieken bevatten. ABCB1 en ABCG2 kunnen, naast hun rol als pomp voor het stamcel fenotype, ook gebruikt worden als nieuwe stamcelmarkers. De expressie van ABCG2 wordt sterk gereguleerd, waarbij ABCG2 het hoogst tot expressie komt op primitieve cellen en afneemt gedurende differentiatie (18). Overexpressie van ABCG2 leidt tot remming van hemopoëse, wat resulteert in minder cellen in het beenmerg en perifeer bloed (51). Deze data suggereren dat ABCG2-expressie een rol speelt in de zelfvernieuwing van vroege stamcellen en het handhaven van het stamcel fenotype door de differentiatie te blokkeren. In tegenstelling tot ABCG2, leidt overexpressie van ABCB1 in beenmergcellen tot proliferatie van SP-cellen, resulterend in verlengde overleving in kweek en verhoogde vernieuwing na transplantatie in muizen (52). Op grond van bovenstaande kan ABCB1-expressie worden gebruikt voor de karakterisering van prolifererende stamcellen, terwijl ABCG2-expressie de rustende stamcellen karakteriseert. Vervolgstudies in muizen welke deficiënt zijn voor deze ABC-transporters of welke ze tot overexpressie brengen zal de precieze rol in stamcellen moeten ontrafelen.

ABC-transporters in de behandeling van AML

ABCB1, ABCC1 en ABCG2 komen zeer hoog tot expressie op normale hemopoëtische stamcellen, de mate van expressie is ook uitgebreid bestudeerd in leukemische blasten in AML. ABCB1 komt vaak tot expressie in oudere patiënten met AML. Expressie van ABCB1 is gevonden bij 17% van de volwassen AML-patiënten jonger dan 35 jaar, bij 38% van de patiënten tussen 35 en 50 jaar, en bij 71% van de patiënten ouder dan 65 jaar (53). Deze toename loopt parallel met een toename in CD34-expressie bij het ouder worden (54). Overexpressie van ABCB1 in blasten van patiënten met AML is geassocieerd met een verminderde cellulaire accumulatie van anticyclines (55). Bovendien heeft ABCB1-overexpressie een negatieve prognostische waarde in de kans op het behalen van een complete remissie alsook een verminderde

leukemievrije en algehele overlevingskans (53, 56-63). Deze observaties hebben geleid tot de introductie van ABCB1-modulators in de behandeling van AML, met de bedoeling drugresistentie te voorkomen door het ABCB1-transport te remmen, en daarbij de accumulatie van cytostatica intracellulair te verhogen.

Verscheidene in-vitrostudies hebben laten zien dat in ABCB1-expresserende cellen geen resistentie ontstaat wanneer er ABCB1-modulators, zoals verapamil, cyclosporine A en PSC833, worden toegevoegd aan de blootstelling aan chemotherapeutica (zoals vincristine, vinblastine, daunorubicine, doxorubicine en idarubicine) (55, 64-67). Deze veelbelovende resultaten hebben de basis gelegd voor klinische studies waarin gekeken is naar de veiligheid en effectiviteit van ABCB1-modulatie in vivo.

De eerste studies waarin gebruik werd gemaakt van de eerste generatie remmers, zoals quinine en cyclosporine A (CsA) waren achteraf gezien teleurstellend; slechts enkele studies rapporteerden een toename van CR en OS (68, 69) welke in latere studies niet reproduceerbaar bleek (70, 71). Door de opgetreden remming op de uitscheiding en eliminatie ontstond er systemische toxiciteit en moest de dosis chemotherapie worden verlaagd. Verder in-vitro-onderzoek leidde tot remmers met grotere potentie, specificiteit en affiniteit voor ABCB1. PSC833, een cyclosporine-D-analoog met 10-voudig grotere potentie voor ABCB1-remming dan CsA, is een typisch voorbeeld van een tweedegeneratiemodulator. Met deze remmer zijn fase-3-studies uitgevoerd in zowel oudere patiënten met AML en in patiënten met recidief of refractaire ziekte. Twee van deze studies zijn vroegtijdig beëindigd door een verhoogde mortaliteit in de PSC833-arm en geen verbetering in CR (72, 73). In twee andere studies werden de voorafgestelde eindpunten, verbeterde ziektevrije overleving of snellere CR, niet gehaald (74, 75). Recent zijn derdegeneratie-ABCB1-remmers ontwikkeld, zoals tariquidar, zosuquidar en laniquidar, deze middelen zijn in vitro zeer specifiek voor ABCB1. Fase-I-studies hebben laten zien dat deze derde generatie remmers veilig kunnen worden gegeven in combinatie met inductiekuren van conventionele chemotherapie (76, 77). Door modulatie van de transporter ontstaat er een verhoogde toxiciteit en een toename van de apoptose. De klinische studies zijn nog gaande, maar tegenvallende resultaten suggereren dat er redundantie is in ABC-transporters en dat de aanwezigheid van andere, nog onbekende, mechanismen van drugresistentie in leukemische cellen in AML een rol spelen (78).

Er zijn slechts enkele studies die hebben gekeken naar de kinetiek van ABC-transporterexpressie gedurende blootstelling aan chemotherapie in vitro, terwijl dit mogelijk ABC-transporters aan het licht brengt waarvan nog niet bekend is dat zij een rol spelen in de bescherming van de cel tegen chemotherapie. Wij hebben gekeken naar de expressie van alle ABC-transporters, in cellijnen en leukemische cellen van patiënten, voorafgaand aan behandeling en gedurende behandeling met chemotherapie (data niet gepubliceerd). Hierbij hebben we laten zien dat de cellen na behandeling een hoge expressie hebben van verschillende ABC-trans-

porters, voornamelijk ABCA-transporters, ten opzichte van de cellen voorafgaand aan behandeling. Al na 24 uur blootstelling aan cytostatica is de expressie van transporters opgereguleerd; dit is snel en verloopt daarom wellicht middels nucleaire factoren. Belangrijke vraag die hierbij speelt is of de verhoging van de expressie van ABC-transporters wordt veroorzaakt door selectie van primitieve cellen met een hogere basale ABC-transporterexpressie of door inductie van ABC-transporters. Ondanks het achterliggende mechanisme overleven de cellen met deze hoge expressie de chemotherapie en is het interessant verder onderzoek te verrichten naar de functionaliteit van deze opgereguleerde transporters.

ABC-transporterexpressie op normale en leukemische hemopoëtische stamcellen

De hoge expressie van specifieke ABC-transportereiwitten betrokken bij multidrugresistentie en daarmee de cellen beschermend tegen cytostatica is uitvoerig beschreven. Echter, de resultaten van de behandeling van AML-patiënten met specifieke ABCB1-remmers heeft nog niet het gewenste resultaat opgeleverd. Dit suggereert dat remming van specifieke transporters onvoldoende effect heeft op de accumulatie van cytostatica, die zou moeten leiden tot een effectievere uitschakeling van leukemische (stam)cellen. De overexpressie van sommige ABC-transporters op primitieve hemopoëtische cellen in vivo kan een handvat zijn voor het verbeteren van antileukemiebehandeling. Het is daarom belangrijk om te bepalen welke transporters aanwezig zijn op normale en leukemische hemopoëtische stamcellen en welke functie ze uitoefenen, zodat deze transporters als aangrijpingspunten voor behandeling gebruikt kunnen worden.

In een genexpressiestudie hebben wij gekeken naar de expressie van alle transmembraan-ABC-transporters in normale en leukemische primitieve cellen (CD34+CD38-) en in meer rijpe voorlopercellen (CD34+CD38+) (79). In-vitro- en in-vivostudies hebben laten zien dat de pluripotente hemopoëtische stamcel zich bevindt in de CD34+CD38-populatie. Populaties van cellen die CD34+CD38- zijn hebben een vergrote potentie om in vitro langetermijnkweken te initiëren (80, 81). De CD34+CD38+cellen kunnen in de kweek duidelijk onderscheiden worden van de CD34+CD38-cellen, ze vormen namelijk geen kolonies voor dag 40. In transplantatie-studies wordt differentiatie gevonden naar elke lijn van bloedcellen, waarbij ook de tussenliggende onrijpe cellen werden gevonden. Dit laat zien dat er vanuit de CD34+CD38-celpopulatie een volledige hemopoëtische uitrijping mogelijk is (82-84). Samenvattend laten deze studies zien dat de marker CD34+CD38- selecteert voor gunstige specifieke stamcelkarakteristieken zoals zelfvernieuwing, proliferatie en differentiatie.

In normale CD34+CD38-cellen werd een brede expressie gevonden van 36 van de 45 gescreende ABC-transporters (figuur 2A), met name de zogenaamde primitieve cellen hadden een hoge expressie ten opzichte van de CD34+CD38+cellen. Het ABC-transporterexpressiepatroon op leukemische CD34+CD38-cellen vertoonde in mate van expressie grote overeenkomst

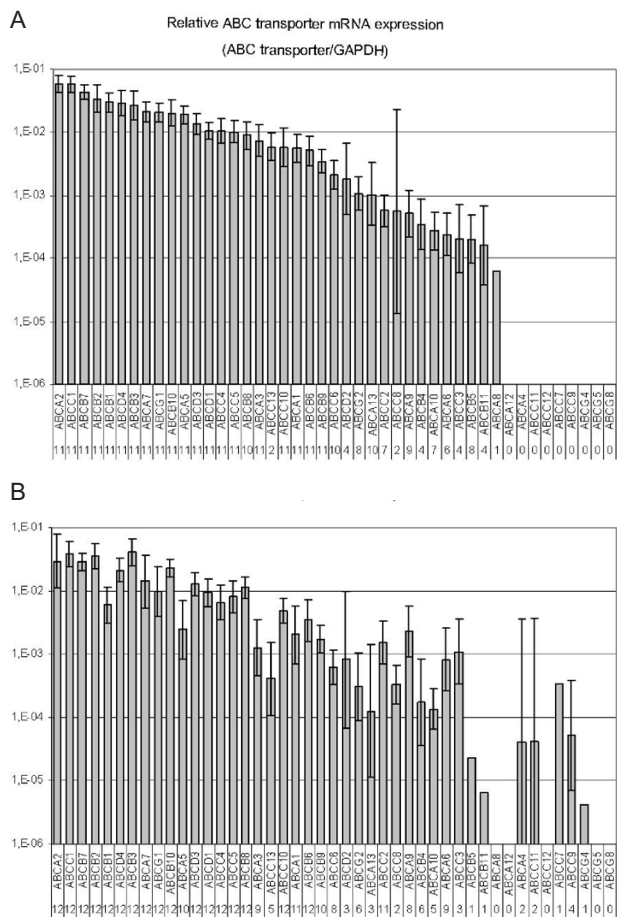
met normale CD34+CD38-cellen, op enkele specifieke uitzonderingen na (figuur 2B) (79). Deze uitzonderingen kunnen deels worden veroorzaakt door chromosomale deleties in de leukemiecellen.

Alle transporters waarvan bekend is dat ze een rol spelen in het transport van en de resistentie tegen farmaceutische middelen kwamen tot expressie op normale en leukemische primitieve cellen. Daarnaast werden verschillende ABC-transporters geïdentificeerd die tot expressie kwamen, maar die niet eerder beschreven zijn als chemotherapietransporter of betrokken zijnd bij resistentie (79). Zowel de nog niet bestudeerde transporters als de regulatie van de transporters na blootstelling vergen nadere bestudering, zowel in vitro als in vivo; ze vormen potentieel therapeutische doelen.

Conclusie

De resultaten van klinische studies met specifieke transporterremmers, om intracellulaire accumulatie

van chemotherapie te verhogen, vallen tegen door een grote redundantie in ABC-transporters, voornamelijk op leukemische stamcellen. Vele ABC-transporters komen tot expressie op normale hemopoëtische stamcellen, grotendeels overeenkomend met leukemische stamcellen. Daarnaast blijkt de expressie van diverse transporters te worden opgereguleerd na blootstelling aan chemotherapie. Deze resultaten vormen mogelijk een basis voor het verbeteren van antileukemiebehandeling. Anderzijds laten steeds meer studies zien dat ABC-transporters mogelijk betrokken zijn bij de differentiatie van cellen, door het pompen van differentiatiefactoren. De functionele rol van ABC-transporters in stamcelbiologie is belangrijk om te onderzoeken in normale stamcellen, aangezien leukemie ontstaat vanuit de normale stamcel. De rol van ABC-transporters in MDR en stamcelbiologie zal verder moeten worden gekarakteriseerd door zowel in-vitro-RNAi- en overexpressiestudies als in-vivotransplantatiemodellen.



Figuur 2. ABC-transporterexpressie in normale en leukemische stamcellen. (A) Genexpressie van 45 ABC-transmembraan-transporters in CD34+CD38- cellen geïsoleerd uit G-CSF-gemobiliseerd perifeer bloed en uit beenmerg (N=11) en (B) in CD34+CD38- cellen van AML-patiënten bij diagnose (N=12). De mate van expressie staat uitgezet op de y-as genormaliseerd voor de expressie van het huishoudgen GAPDH. Gemiddelde expressie van de positieve monsters (+ 95% betrouwbaarheids-interval) is weergegeven in de balken. Op de X-as staan de ABC-transporters met de frequentie van expressie (aantal monsters waarin de ABC-transporters detecteerbaar waren).

Referenties

- Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* 2001 Jul; 11 (7): 1156-66.
- Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2002 Jan; 2 (1): 48-58.
- Higgins CF. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 1992; 8: 67-113.
- Dean M, Hamon Y, Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* 2001 Jul; 42 (7): 1007-17.
- Kaminski WE, Wenzel JJ, Piehler A, Langmann T, Schmitz G. ABCA6, a novel subclass ABC transporter. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 Aug 3; 285 (5): 1295-301.
- Piehler A, Kaminski WE, Wenzel JJ, Langmann T, Schmitz G. Molecular structure of a novel cholesterol-responsive A subclass ABC transporter, ABCA9. *Biochem Biophys Res Commun* 2002 Jul 12; 295 (2): 408-16.
- Wenzel JJ, Kaminski WE, Piehler A, Heimerl S, Langmann T, Schmitz G. ABCA10, a novel cholesterol-regulated ABCA6-like ABC transporter. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 Jul 11; 306 (4): 1089-98.
- Van Berge-Henegouwen GP, Vennema NG, Portincasa P, Kosters A, van Erpecum KJ, Groen AK. Relevance of hereditary defects in lipid transport proteins for the pathogenesis of cholesterol gallstone disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 2004; (241): 60-9.
- Ross DD, Doyle LA. Mining our ABCs: pharmacogenomic approach for evaluating transporter function in cancer drug resistance. *Cancer Cell* 2004 Aug; 6 (2): 105-7.
- Szakacs G, Annereau JP, Lababidi S, Shankavaram U, Arciello A, Bussey KJ, et al. Predicting drug sensitivity and resistance: profiling ABC transporter genes in cancer cells. *Cancer Cell* 2004 Aug; 6 (2): 129-37.
- Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989 Sep 8; 245 (4922): 1073-80.
- Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* 2000 Aug 16; 92 (16): 1295-302.
- Wanders RJ, Visser WF, van Roermund CW, Kemp S, Waterham HR. The peroxisomal ABC transporter family. *Pflügers Arch* 2007 Feb; 453 (5): 719-34.

14. Moser HW, Fatemi A, Zackowski K, Smith S, Golay X, Muenz L, et al. Evaluation of therapy of X-linked adrenoleukodystrophy. *Neurochem Res* 2004 May; 29 (5): 1003-16.
15. Zhao Z, Fang LL, Johnsen R, Baillie DL. ATP-binding cassette protein E is involved in gene transcription and translation in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun* 2004 Oct 8; 323 (1): 104-11.
16. Kerr ID. Sequence analysis of twin ATP binding cassette proteins involved in translational control, antibiotic resistance, and ribonuclease L inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 2004 Feb 27; 315 (1): 166-73.
17. Mickley L, Jain P, Miyake K, Schriml LM, Rao K, Fojo T, et al. An ATP-binding cassette gene (ABCG3) closely related to the multidrug transporter ABCG2 (MXR/ABCP) has an unusual ATP-binding domain. *Mamm Genome* 2001 Jan; 12 (1): 86-8.
18. Scharenberg CW, Harkey MA, Torok-Storb B. The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood* 2002 Jan 15; 99 (2): 507-12.
19. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 1976 Nov 11; 455 (1): 152-62.
20. Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39: 361-98.
21. Litman T, Druley TE, Stein WD, Bates SE. From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cell Mol Life Sci* 2001 Jun; 58 (7): 931-59.
22. Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty C, Sauna ZE, Gottesman MM. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* 2003 Oct 20; 22 (47): 7468-85.
23. Loo TW, Clarke DM. Defining the drug-binding site in the human multidrug resistance P-glycoprotein using a methanethiosulfonate analog of verapamil, MTS-verapamil. *J Biol Chem* 2001 May 4; 276 (18): 14972-9.
24. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987 Nov; 84 (21): 7735-8.
25. Schinkel AH, Mayer U, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L, Smit JJ, et al. Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking mdr1-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 Apr 15; 94 (8): 4028-33.
26. Schinkel AH. The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Semin Cancer Biol* 1997 Jun; 8 (3): 161-70.
27. Mirski SE, Gerlach JH, Cole SP. Multidrug resistance in a human small cell lung cancer cell line selected in adriamycin. *Cancer Res* 1987 May 15; 47 (10): 2594-8.
28. Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 1992 Dec 4; 258 (5088): 1650-4.
29. Deeley RG, Westlake C, Cole SP. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiol Rev* 2006 Jul; 86 (3): 849-99.
30. Zhang DW, Nunoya K, Vasa M, Gu HM, Cole SP, Deeley RG. Mutational analysis of polar amino acid residues within predicted transmembrane helices 10 and 16 of multidrug resistance protein 1 (ABCC1): effect on substrate specificity. *Drug Metab Dispos* 2006 Apr; 34 (4): 539-46.
31. Feller N, Broxterman HJ, Wahrer DC, Pinedo HM. ATP-dependent efflux of calcein by the multidrug resistance protein (MRP): no inhibition by intracellular glutathione depletion. *FEBS Lett* 1995 Jul 17; 368 (2): 385-8.
32. Jones TR, Zamboni R, Belley M, Champion E, Charette L, Ford-Hutchinson AW, et al. Pharmacology of L-660,711 (MK-571): a novel potent and selective leukotriene D4 receptor antagonist. *Can J Physiol Pharmacol* 1989 Jan; 67 (1): 17-28.
33. Draper MP, Martell RL, Levy SB. Indomethacin-mediated reversal of multidrug resistance and drug efflux in human and murine cell lines overexpressing MRP, but not P-glycoprotein. *Br J Cancer* 1997; 75 (6): 810-5.
34. Flens MJ, Zaman GJ, van de Valk P, Izquierdo MA, Schroeijers AB, Scheffer GL, et al. Tissue distribution of the multidrug resistance protein. *Am J Pathol* 1996 Apr; 148 (4): 1237-47.
35. Wijnholds J, Scheffer GL, van der Valk M, van der Valk P, Beijnen JH, Scheper RJ, et al. Multidrug resistance protein 1 protects the oropharyngeal mucosal layer and the testicular tubules against drug-induced damage. *J Exp Med* 1998 Sep 7; 188 (5): 797-808.
36. Wijnholds J, De Lange EC, Scheffer GL, van den Berg DJ, Mol CA, van der Valk M, et al. Multidrug resistance protein 1 protects the choroid plexus epithelium and contributes to the blood-cerebrospinal fluid barrier. *J Clin Invest* 2000 Feb; 105 (3): 279-85.
37. Beedholm-Ebsen R, van de Wetering K, Hardlei T, Nexø E, Borst P, Moestrup SK. Identification of multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) as a molecular gate for cellular export of cobalamin. *Blood* 2010 Feb 25; 115 (8): 1632-9.
38. Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Dec 22; 95 (26): 15665-70.
39. Rabindran SK, Ross DD, Doyle LA, Yang W, Greenberger LM. Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. *Cancer Res* 2000 Jan 1; 60 (1): 47-50.
40. Allen JD, van Loevezijn A, Lakhai JM, van der Valk M, van Tellingener O, Reid G, et al. Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter in vitro and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C. *Mol Cancer Ther* 2002 Apr; 1 (6): 417-25.
41. Abbott BL. ABCG2 (BCRP) expression in normal and malignant hematopoietic cells. *Hematol Oncol* 2003 Sep; 21 (3): 115-30.
42. Ross DD, Yang W, Abruzzo LV, Dalton WS, Schneider E, Lage H, et al. Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone-selected cell lines. *J Natl Cancer Inst* 1999 Mar 3; 91 (5): 429-33.
43. Allen JD, Schinkel AH. Multidrug resistance and pharmacological protection mediated by the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Mol Cancer Ther* 2002 Apr; 1 (6): 427-34.
44. Jonker JW, Buitelaar M, Wagenaar E, van der Valk MA, Scheffer GL, Scheper RJ, et al. The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 Nov 26; 99 (24): 15649-54.
45. Gillet JP, Efferth T, Steinbach D, Hamels J, de Longueville F, Bertholet V, et al. Microarray-based detection of multidrug resistance in human tumor cells by expression profiling of ATP-binding cassette transporter genes. *Cancer Res* 2004 Dec 15; 64 (24): 8987-93.
46. Chaudhary PM, Roninson IB. Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell* 1991 Jul 12; 66 (1): 85-94.
47. Uchida N, Combs J, Chen S, Zanjani E, Hoffman R, Tsukamoto A. Primitive human hematopoietic cells displaying differential efflux of the rhodamine 123 dye have distinct biological activities. *Blood* 1996 Aug 15; 88 (4): 1297-305.
48. Zijlmans JM, Visser JW, Kleiverda K, Kluin PM, Willemze R, Fibbe WE. Modification of rhodamine staining allows identification of hematopoietic stem cells with preferential short-term or long-term bone marrow-repopulating ability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 Sep 12; 92 (19): 8901-5.

49. Bunting KD. ABC transporters as phenotypic markers and functional regulators of stem cells. *Stem Cells* 2002; 20 (1): 11-20.
50. Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, et al. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* 2001 Sep; 7 (9): 1028-34.
51. Ueda T, Brenner S, Malech HL, Langemeijer SM, Perl S, Kirby M, et al. Cloning and functional analysis of the rhesus macaque ABCG2 gene. Forced expression confers an SP phenotype among hematopoietic stem cell progeny in vivo. *J Biol Chem* 2005 Jan 14; 280 (2): 991-8.
52. Bunting KD, Zhou S, Lu T, Sorrentino BP. Enforced P-glycoprotein pump function in murine bone marrow cells results in expansion of side population stem cells in vitro and repopulating cells in vivo. *Blood* 2000 Aug 1; 96 (3): 902-9.
53. Leith CP, Kopecky KJ, Chen IM, Eijdem L, Slovak ML, McConnell TS, et al. Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study. *Blood* 1999 Aug 1; 94 (3): 1086-99.
54. te Boekhorst PA, de Leeuw K, Schoester M, Wittebol S, Nooter K, Hagemeijer A, et al. Predominance of functional multidrug resistance (MDR-1) phenotype in CD34+ acute myeloid leukemia cells. *Blood* 1993 Nov 15; 82 (10): 3157-62.
55. Nooter K, Sonneveld P, Oostrum R, Herweijer H, Hagenbeek T, Valerio D. Overexpression of the *mdr1* gene in blast cells from patients with acute myelocytic leukemia is associated with decreased anthracycline accumulation that can be restored by cyclosporin-A. *Int J Cancer* 1990 Feb 15; 45 (2): 263-8.
56. Del PG, Stasi R, Aronica G, Venditti A, Cox MC, Bruno A, et al. Clinical relevance of P-glycoprotein expression in de novo acute myeloid leukemia. *Blood* 1996 Mar 1; 87 (5): 1997-2004.
57. Legrand O, Simonin G, Perrot JY, Zittoun R, Marie JP. Pgp and MRP activities using calcein-AM are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia patients. *Blood* 1998 Jun 15; 91 (12): 4480-8.
58. Legrand O, Simonin G, Beauchamp-Nicoud A, Zittoun R, Marie JP. Simultaneous activity of MRP1 and Pgp is correlated with in vitro resistance to daunorubicin and with in vivo resistance in adult acute myeloid leukemia. *Blood* 1999 Aug 1; 94 (3): 1046-56.
59. Leith CP, Kopecky KJ, Godwin J, McConnell T, Slovak ML, Chen IM, et al. Acute myeloid leukemia in the elderly: assessment of multidrug resistance (MDR1) and cytogenetics distinguishes biologic subgroups with remarkably distinct responses to standard chemotherapy. A Southwest Oncology Group study. *Blood* 1997 May 1; 89 (9): 3323-9.
60. Senent L, Jarque I, Martin G, Sempere A, Gonzalez-Garcia Y, Gomis F, et al. P-glycoprotein expression and prognostic value in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 1998 Sep; 83 (9): 783-7.
61. van den Heuvel-Eibrink MM, van der Holt B, te Boekhorst PA, Pieters R, Schoester M, Lowenberg B, et al. MDR 1 expression is an independent prognostic factor for response and survival in de novo acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 1997 Oct; 99 (1): 76-83.
62. van den Heuvel-Eibrink MM, Sonneveld P, Pieters R. The prognostic significance of membrane transport-associated multidrug resistance (MDR) proteins in leukemia. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2000 Mar; 38 (3): 94-110.
63. Willman CL. The prognostic significance of the expression and function of multidrug resistance transporter proteins in acute myeloid leukemia: studies of the Southwest Oncology Group Leukemia Research Program. *Semin Hematol* 1997 Oct; 34 (4 Suppl 5): 25-33.
64. Krishna R, Mayer LD. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur J Pharm Sci* 2000 Oct; 11 (4): 265-83.
65. Michieli M, Damiani D, Michelutti A, Melli C, Russo D, Fanin R, et al. p170-dependent multidrug resistance. Restoring full sensitivity to idarubicin with verapamil and cyclosporin A derivatives. *Haematologica* 1994 Mar; 79 (2): 119-26.
66. Solary E, Bidan JM, Calvo F, Chauffert B, Caillot D, Mugneret F, et al. P-glycoprotein expression and in vitro reversion of doxorubicin resistance by verapamil in clinical specimens from acute leukaemia and myeloma. *Leukemia* 1991 Jul; 5 (7): 592-7.
67. Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, Sakurai Y. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res* 1981 May; 41 (5): 1967-72.
68. List AF, Kopecky KJ, Willman CL, Head DR, Persons DL, Slovak ML, et al. Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood* 2001 Dec 1; 98 (12): 3212-20.
69. Wattel E, Solary E, Hecquet B, Caillot D, Ifrah N, Brion A, et al. Quinine improves results of intensive chemotherapy (IC) in myelodysplastic syndromes (MDS) expressing P-glycoprotein (PGP). Updated results of a randomized study. Groupe Francais des Myelodysplasies (GFM) and Groupe GOELAMS. *Adv Exp Med Biol* 1999; 457: 35-46.
70. Liu Yin JA, Wheatley K, Rees JK, Burnett AK. Comparison of 'sequential' versus 'standard' chemotherapy as re-induction treatment, with or without cyclosporine, in refractory/relapsed acute myeloid leukaemia (AML): results of the UK Medical Research Council AML-R trial. *Br J Haematol* 2001 Jun; 113 (3): 713-26.
71. Solary E, Witz B, Caillot D, Moreau P, Desablens B, Cahn JY, et al. Combination of quinine as a potential reversing agent with mitoxantrone and cytarabine for the treatment of acute leukemias: a randomized multicenter study. *Blood* 1996 Aug 15; 88 (4): 198-205.
72. Advani R, Saba HI, Tallman MS, Rowe JM, Wiernik PH, Ramek J, et al. Treatment of refractory and relapsed acute myelogenous leukemia with combination chemotherapy plus the multidrug resistance modulator PSC 833 (Valspodar). *Blood* 1999 Feb 1; 93 (3): 787-95.
73. Greenberg PL, Lee SJ, Advani R, Tallman MS, Sikic BI, Letendre L, et al. Mitoxantrone, etoposide, and cytarabine with or without valspodar in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome: a phase III trial (E2995). *J Clin Oncol* 2004 Mar 15; 22 (6): 1078-86.
74. Baer MR, George SL, Dodge RK, O'Loughlin KL, Minderman H, Caligiuri MA, et al. Phase 3 study of the multidrug resistance modulator PSC-833 in previously untreated patients 60 years of age and older with acute myeloid leukemia: Cancer and Leukemia Group B Study 9720. *Blood* 2002 Aug 15; 100 (4): 1224-32.
75. van der Holt B, Lowenberg B, Burnett AK, Knauf WU, Shepherd J, Piccaluga PP, et al. The value of the MDR1 reversal agent PSC-833 in addition to daunorubicin and cytarabine in the treatment of elderly patients with previously untreated acute myeloid leukemia (AML), in relation to MDR1 status at diagnosis. *Blood* 2005 Oct 15; 106 (8): 2646-54.
76. Gerrard G, Payne E, Baker RJ, Jones DT, Potter M, Prentice HG, et al. Clinical effects and P-glycoprotein inhibition in patients with acute myeloid leukemia treated with zo-suquidar trihydrochloride, daunorubicin and cytarabine. *Haematologica* 2004 Jul; 89 (7): 782-90.

77. Sandler A, Gordon M, De Alwis DP, Pouliquen I, Green L, Marder P, et al. A Phase I trial of a potent P-glycoprotein inhibitor, zosuquidar trihydrochloride (LY335979), administered intravenously in combination with doxorubicin in patients with advanced malignancy. *Clin Cancer Res* 2004 May 15; 10 (10): 3265-72.
78. Mahadevan D, List AF. Targeting the multidrug resistance-1 transporter in AML: molecular regulation and therapeutic strategies. *Blood* 2004 Oct 1; 104 (7): 1940-51.
79. de Grouw EP, Raaijmakers MH, Boezeman JB, van der Reijden BA, van de Locht LT, de Witte TJ, et al. Preferential expression of a high number of ATP binding cassette transporters in both normal and leukemic CD34+. *Leukemia* 2006 Apr; 20 (4): 750-4.
80. Hao QL, Thiemann FT, Petersen D, Smogorzewska EM, Crooks GM. Extended long-term culture reveals a highly quiescent and primitive human hematopoietic progenitor population. *Blood* 1996 Nov 1; 88 (9): 3306-13.
81. Hao QL, Shah AJ, Thiemann FT, Smogorzewska EM, Crooks GM. A functional comparison of CD34+. *Blood* 1995 Nov 15; 86 (10): 3745-53.
82. Ishikawa F, Yasukawa M, Lyons B, Yoshida S, Miyamoto T, Yoshimoto G, et al. Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor {gamma} chain(null) mice. *Blood* 2005 Sep 1; 106 (5): 1565-73.
83. Kollet O, Spiegel A, Peled A, Petit I, Byk T, Herschkoviz R, et al. Rapid and efficient homing of human CD34(+) CD38(-/low)CXCR4(+) stem and progenitor cells to the bone marrow and spleen of NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. *Blood* 2001 May 15; 97 (10): 3283-91.
84. Ishikawa F, Livingston AG, Minamiguchi H, Wingard JR, Ogawa M. Human cord blood long-term engrafting cells are CD34+ CD38-. *Leukemia* 2003 May; 17 (5): 960-4.
85. Uitto J. The gene family of ABC transporters: novel mutations, new phenotypes. *Trends Mol Med* 2005 Aug; 11 (8): 341-3.

Summary

Grouw PLM de, Raaijmakers RAP. The role of ABC transporters in physiology and pathophysiology, and in resistance to chemotherapy. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2010; 35: 220-229.

ABC-genes represent a large family of transmembrane proteins, which are expressed in all living cells and are essential for energy-dependent transport. Mutations in ABC genes cause or contribute to many genetic disorders, for example cystic fibrosis. ABC-transporters are extensively studied for their role in the development of chemotherapeutic resistance. Over-expression results in increased cellular efflux for a specific drug, but also for other, structurally unrelated drugs referred to as multidrug resistance. Clinical studies with specific inhibitors, to increase intracellular accumulation of chemotherapeutic compounds, are disappointing, because of redundancy in ABC-transporter expression in leukemic cells in AML. ABC-transporters are also broadly expressed in normal hematopoietic stem cells, strongly overlapping with leukemic stem cells. Furthermore, exposure to chemotherapy results in a rapid upregulation of ABC transporters. These insights can be exploited for future development of more adequate antileukemic treatment.

Keywords: ABC transporters; drug resistance; hematopoietic stem cells; acute myeloid leukemia